

3. METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian tentang pengaruh pemberian probiotik dengan dosis yang berbeda pada pakan terhadap retensi protein, retensi lemak dan retensi energi pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) antara lain akuarium ukuran 80x40x40 cm³ dengan tinggi air 15,6 cm dengan volume air 50 liter, aerator, selang aerasi, batu aerasi, DO meter merk *Lovibond*, pH meter, timbangan digital, timbangan analitik, spektrofotometer merk *Thermo Spectronic HELIOS α*, jangka sorong, seser, baskom, loyang, mortar dan alu, labu destruksi, *soxhlet*, oven, cawan petri, cawan porselen, kompor listrik, pendingin balik, muffle merk *Nabertherm*, *destilator*, titrasi set, corong, desikator, *crushable tank*, *beaker glass*, erlenmeyer, panci kukus, refraktometer, penggaris, dan kain saring.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan bahan yang digunakan pada penelitian tentang pengaruh pemberian probiotik dengan dosis yang berbeda pada pakan terhadap retensi protein, retensi lemak dan retensi energi pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) antara lain ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) dengan ukuran 5-7 dengan berat 3 gram, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, air tawar, air kelapa tua, pakan ikan komersil merk *MS Prima feed PF500*, klorin, NaThiosulfat, alkohol 70%, tissue, kapas, kain saring, aquadest, benang kasur, jarum ose, kertas koran, kertas label, alumunium foil, spirtus, TSB (*Tryptone Soy Broth*), TSA (*Tryptone Soy Agar*), PCA (*Plate Count Agar*), NaCl, plastik wrap, jahe merah, kunyit, temulawak, gula merah, susu segar, tetes (molase), dedak halus,

markisa atau nanas, kencur, bawang putih, yakult, air kelapa, lengkuas, temu ireng, ragi, pupuk nitrogen ZA, Kapur kaptan (CaCO_3)

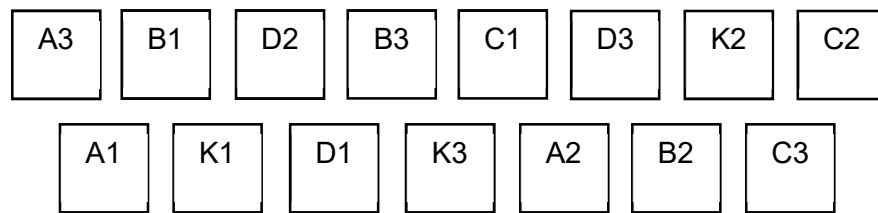
3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimen. Merupakan metode yang dilakukan dengan cara melakukan percobaan secara langsung dengan maksud menguji hipotesis. Hal ini sesuai dengan pernyataan Wasis (2008), metode eksperimen merupakan metode penelitian yang dilakukan dengan maksud menguji hipotesis berbentuk hubungan sebab-akibat melalui pemanipulasian variabel independen dan menguji bagaimana perubahannya.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana diberikan perlakuan yang berbeda secara acak dalam satu kelompok. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sastrosupadi (2000), Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau wadah percobaan yang seragam atau homogen. Menurut Pratisto (2004), rancangan acak Lengkap merupakan rancangan percobaan yang paling sederhana diantara rancangan percobaan standar lainnya. Beberapa keuntungan menggunakan rancangan acak lengkap antara lain: 1). Denah perancangan percobaannya lebih mudah. 2). Analisa statistik terhadap objek percobaan sederhana. 2). Fleksibel dalam jumlah penggunaan, perlakuan dan ulangan. Perlakuan yang digunakan penambahan variasi probiotik pada pakan yaitu terdiri dari empat perlakuan dengan tiga kali ulangan:

- A : Perlakuan pakan dengan penambahan probiotik A dosis 5 ml/kg pakan.
- B : Perlakuan pakan dengan penambahan probiotik B dosis 5 ml/kg pakan.
- C : Perlakuan pakan dengan penambahan probiotik A dosis 10 ml/kg pakan.
- D : Perlakuan pakan dengan penambahan probiotik B dosis 10 ml/kg pakan.
- K : Perlakuan kontrol tanpa penambahan probiotik.



Gambar 3. Denah Percobaan

Keterangan :

A, B, C, D, K : Perlakuan
1, 2, 3 : Ulangan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat

Tong fiber yang dipergunakan untuk kultur probiotik disterilisasi menggunakan larutan klorin 30 ppm. Tong berukuran 40 liter diisi dengan air hingga penuh kemudian di berikan larutan klorin 30 ppm dan di diamkan selama 24 jam. Setelah 24 jam air dalam tong fiber diberikan larutan NaThiosulfat sebesar 15 ppm. Kemudian didiamkan selama 24 jam.

Media pemeliharaan ikan tidak disterilisasi, namun, dilakukan aerasi selama 24 jam *nonstop* sebelum digunakan sebagai media pemeliharaan. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Sari dan Manan (2012), pada bak pemeliharaan tambahkan larutan kaporit 20-30 ppm direndam selama 24 jam. Media yang sudah steril perlu dinetralkan dengan Natrium Thiosulfat 10 ppm dan diaerasi dengan kuat, hal ini bertujuan menghilangkan kaporit yang tersisa, sedangkan media pembuatan dan bahan-bahan probiotik sebelum diisolasi bakteri dimasak di atas kompor pada suhu 100°C.

3.4.2 Penyiapan Media

a. Media Isolasi Bakteri

Media isolasi yang digunakan yaitu media agar berupa TSA dan media cair berupa TSB dengan NaCl 2%. Media TSA dan TSB ditimbang untuk diencerkan

pada 60 ml aquadest. Penghitungan TSA dan TSB yaitu dosis untuk setiap liternya dikalikan jumlah ml aquadest. Dosis untuk TSB yaitu 30 gram/L dan TSA sebesar 37 gram/L. Media yang telah ditimbang dilarutkan dengan aquadest dalam erlenmeyer 100 ml. Media telah siap untuk disterilisasi.

b. Media Tumbuh Kandidat Probiotik selama Fermentasi

Media tumbuh yaitu air kelapa tua yang dimasak pada suhu 100⁰ C. Air kelapa diketahui memiliki kandungan nutrisi yang baik untuk media tumbuh bakteri. Bahan-bahan lain yang digunakan meliputi rempah-rempah, molase, ragi dan inokulan bakteri.

3.4.3 Penyiapan Isolat Bakteri

Isolat Bakteri *B. subtilis*, *Nitrosomonas* sp, dan *Nitrobacter* sp. diperoleh dari kultur murni BBPBAP Jepara. Selanjutnya dilakukan peremajaan pada media agar TSA selama 24 jam inkubasi kemudian di tanam pada media cair TSB selama 24 jam inkubasi. Peremajaan ini dilakukan untuk melihat kurva pertumbuhan masing-masing bakteri. Isolat bakteri dari media agar diambil dengan menggunakan jarum ose pada ruang steril. Isolat ditanam pada media TSB dalam sebanyak 1 ose, selanjutnya diinkubasi pada suhu 35⁰ C.

Pertumbuhan sel bakteri diamati setiap jam pada 5 jam pertama. Kemudian setiap 2 jam sekali dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Kepadatan bakteri yang didapatkan untuk diisolasi pada media tumbuh sebagai kandidat probiotik yaitu *B. subtilis* 10⁹ CFU/ml, *Nitrosomonas* sp. 10⁸ CFU/ml, dan *Nitrobacter* sp. 10¹⁰ CFU/ml.

3.4.4 Persiapan Hewan Uji

Ikan yang digunakan adalah ikan Lele (*C. gariepinus*) yang di peroleh dari pembudidaya ikan di Malang, Jawa Timur. Ikan lele yang dipilih adalah ikan yang

sehat sebanyak 900 ekor dengan berat awal rata rata $3 \pm 0,02$ gram dan dilakukan aklimatisasi di bak penampungan selama 7 hari. Selama aklimatisasi ikan lele diberi pakan dengan pakan komersil dengan frekuensi 3 kali sehari.

3.4.5 Pembuatan Media Tumbuh Bakteri Sebagai Kandidat Probiotik

Bahan-bahan yang digunakan pada pembuatan disiapkan berdasarkan komposisi variasi probiotik sebagai berikut:

Tabel 2. Komposisi Probiotik A

Komposisi	Cara Pembuatan
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Jahe merah 0,9 kg ➤ Molase 1,5 Liter ➤ Kunyit 1,5 kg ➤ Dedak Halus 600 gr ➤ Temulawak 1,5 kg ➤ Nanas 900 gr ➤ Gula Merah 1,5 kg ➤ Air tawar 30 Liter ➤ Susu segar 1,5 Liter ➤ Inokulan bakteri <i>B. subtilis</i>, <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Nitrobacter</i> sp. (4 ml/liter). 	<ol style="list-style-type: none"> 1. empah-rempah (jahe merah, kunyit putih, temulawak) dicuci dan dipotong kecil-kecil, kemudian dihaluskan dengan diskmill 2. Rempah-rempah, gula merah, dedak, tetes dimasak pada suhu 100°C 3. Buah markisa/Nanas dihaluskan dengan blender, lalu dipanaskan bersama susu pada suhu 60°C agar vitamin C tidak rusak 4. Seluruh bahan dimasukkan ke dalam wadah dalam kondisi masih panas (sampai penuh) 5. Didinginkan selama 48 jam sampai dingin dengan kondisi tertutup rapat 6. Setelah 48 jam dimasukkan bakteri (4ml/l) 7. Ditutup rapat (kedap udara) , difermentasi selama 1 bulan 8. Apabila ada tekanan berlebihan, gas dikeluarkan 9. Setelah 1 bulan probiotik siap digunakan dan dikemas

Tabel 3. Komposisi Probiotik B

Komposisi	Cara Pembuatan
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Air kelapa tua 30 liter ➤ Molase 3 Liter ➤ Kunyit putih 300 gr ➤ Lengkuas 150 gr ➤ Temulawak 300 gr ➤ Jahe merah 300 gr ➤ Kencur 150 gr ➤ Temu ireng 150 gr ➤ Bawang putih 300 gr ➤ Ragi 9 butir ➤ Yakult 12 botol (780ml) ➤ Inokulan bakteri <i>B. subtilis</i>, <i>Nitrosomonas</i> sp., <i>Nitrobacter</i> sp. (4 ml/l) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Semua bahan dihaluskan dengan diselep. 2. Dimasak kecuali ragi dan yakult. 3. Dibiarkan agak dingin, tambahkan ragi dan yakult dan inokulan bakteri. 4. Homogenkan bahan dan simpan dalam tempat tertutup tanpa udara.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

Adapun tahapan penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut :

- Ikan lele terlebih dahulu di puasakan selama satu hari bertujuan untuk pengosongan lambung.
- Ikan lele dilakukan pengujian kadar protein, lemak dan energi awal serta penimbangan bobot awal (W_0) dan agar ukuran ikan lele dalam aquarium seragam.

- Ikan lele ditebar dengan kepadatan 1 ekor per liter atau 50 ekor per akuarium. Akuarium dengan ukuran 80x40x40 cm³ tinggi air 15,6 cm dengan volume 50 liter.
- Pemberian pakan dilakukan dengan 5% dari total biomassa ikan perhari dengan frekuensi sebanyak 3 kali sehari yaitu pada pukul 07.00, 12.00 dan 17.00 WIB yang dibagi dengan porsi 30% (pagi), 30% (siang) dan 40% (sore).
- Pengukuran suhu, pH dan DO dilakukan sebanyak 2 kali sehari yaitu pada pagi dan sore.
- Pengamatan pertumbuhan dilakukan setiap 7 hari sekali meliputi bobot tubuh ikan (W_t) yang berguna untuk menyesuaikan jumlah pakan yang harus diberikan selama 7 hari berikutnya.
- Tingkat kelulusan hidup (*Survival Rate* = SR) dihitung di akhir penelitian.
- Ikan lele di uji proksimat dan dilakukan perhitungan nilai retensi protein, lemak dan energi di akhir penelitian.

3.6 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

a. Retensi Protein (RP)

Retensi protein merupakan banyaknya protein yang dibutuhkan oleh ikan untuk proses pertumbuhan dan dinyatakan dalam persen (%). Menurut Buwono (2000), retensi protein dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$RP = \frac{\sum P_t - \sum P_0}{\sum PP} \times 100 \%$$

Keterangan :

RP = Retensi protein (%)

$\sum P_0$ = Jumlah protein tubuh awal penelitian (g)

$\sum P_t$ = Jumlah protein tubuh akhir penelitian (g)

$\sum PP$ = Jumlah protein pakan (g)

b. Retensi Lemak

Retensi lemak yaitu sejumlah lemak dari pakan yang diberikan terkonversi menjadi lemak yang tersimpan dalam tubuh ikan. Menurut Buwono (2000), retensi lemak dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$RL = \frac{\sum L_t - \sum L_0}{\sum LP} \times 100 \%$$

Keterangan:

RL = Retensi lemak (%)

$\sum L_0$ = Jumlah lemak tubuh awal penelitian (g)

$\sum L_t$ = Jumlah lemak tubuh akhir penelitian (g)

$\sum LP$ = Jumlah lemak pakan (g)

c. Retensi Energi

Retensi energi yaitu banyaknya energi yang disimpan dalam bentuk jaringan tubuh ikan dibagi dengan banyaknya energi dalam pakan yang dikonsumsi. Menurut Thung dan Shiau (1991), retensi energi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Retensi Energi} = \frac{\text{Energi tubuh akhir} - \text{energi tubuh awal}}{\text{Total energi pakan yang diberikan}} \times 100\%$$

3.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang yang digunakan adalah kualitas air. Parameter kualitas air yang diamati dalam penelitian ini terdiri dari suhu, pH, dan oksigen terlarut. Adapun rangkaian kegiatan pengukuran kualitas air yang dilakukan adalah sebagai berikut :

- Pengukuran suhu dilakukan dengan menggunakan termometer dan dilakukan dua kali pengukuran dalam satu hari (pagi dan sore).

- Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter dan dilakukan dua kali pengukuran dalam satu hari (pagi dan sore).
- Pengukuran oksigen terlarut dilakukan dengan menggunakan DO meter dan dilakukan dua kali pengukuran dalam satu hari (pagi dan sore).

3.7 Analisa Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena media dan bahan percobaan seragam atau dapat dianggap seragam . Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan sidik ragam (ANOVA) dengan selang kepercayaan 95% untuk mengetahui apakah perlakuan memberikan pengaruh. Apabila dari data sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata atau berbeda sangat nyata, maka dilanjutkan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk membandingkan nilai antar perlakuan.